

Title	視細胞外節におけるイオン過程の研究
Author(s)	世古口, 雄三; 赤星, 光彦; 松谷, 幸司 他
Citation	大阪外国語大学学報. 38 p.179-p.192
Issue Date	1977-03-15
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/80615
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

視細胞外節におけるイオン過程の研究

世古口 雄 三・赤 星 光 彦^{*1}・松 谷 幸 司^{*2}・松 本 昭^{*3}

Studies of the Ionic Processes in Retinal Rod Outer Segments

Yuzo SEKOGUTI, Mitsuhiro AKABOSHI,
Kōzi, MATUTANI, & Akira MATSUMOTO

ABSTRACT (Résumé)

It was observed by Tomita, et al (1967) that the vertebrate photoreceptor cells kept the depolarization in the dark and hyperpolarized upon illumination, and also suggested by Tomita (1970) that, while the depolarization in the dark is associated with an increase in conductance mainly to Na-ions, the ionic mechanism of this hyperpolarization is associated with decrease in conductance of the photoreceptor membrane for Na-ions. Moreover, it has been assumed by Hagins (1972) that the dark current of photoreceptor cells is controlled by the activity of Ca-ions in their cytoplasm, and that the current-suppressing effect of light is localized to the particular region of an outer segment, where photons are absorbed (Ca-ion hypothesis).

Since several years the authors have carried out the experiments for the effect of light on the ion-levels, especially Na- and K-level, in cattle rod outer segments with the method of radio-activation analysis. From the results obtained it was suggested that Na-loss from cattle rod outer segments was inhibited with illumination, and also in crucian carp rod outer segments, the inhibition of Na-loss by light was observed. These facts suggested that the permeability of Na-ion to the plasma membrane of rod outer segment was suppressed by light. Furthermore, on the assumption that our samples prepared from cattle retinas were made of the disc-suspension of rod outer segments, it was discussed that the results obtained suggest to participate in the transport of Ca-ion from the disc to the plasma membrane of photoreceptor outer segment.

I. 視覚初期過程の電気生理学的研究

視覚過程の現象解析には電気生理学的研究が最適な方法の1つとされていたが、Granit¹⁾が網膜電位図(ERG)の成分を3成分に分析し、そのうちP III が視細胞に由来するのではないかと考察してより、受容器電位あるいは発生器電位の発生機構に関する研究が特に注目されるに至った。

1962年、Hagins²⁾がイカの網膜を材料にして、巧妙な方法で微小電極を視細胞表面におき、微小光束を照射することにより脱分極性の電位変化を観察し、えた結果の分析から前記の電位変化が発生器電位としての役割を果たすことを結論した。一方脊椎動物のカメラ眼ではそのような発生器電位が検出できずにいた。しかし1965年以降、当時の慶応義塾大学の富田教授のグループが極微小電極を使用し、特殊なまた優れた技術でコイの円錐細胞(錐体)から単一細胞電位の誘導に成功し、光刺激で細胞固有の電位変化を示すことを観察した³⁾。この電位変化は無脊椎動物のカメラ眼である前述のイカの場合と異なり、過分極性であり、現在までのところ、研究された脊椎動物の光受容器ではすべて同じ極性変化を示し、さらに棒細胞(杆体)でも同様な変化であることが判明した。その後、豊田らにより、光刺激で視細胞外節の細胞膜の抵抗が増大することが観察された結果⁴⁾、過分極性電位変化が生ずるのは、暗状態では視細胞外節へNa⁺イオンが流入(Na-influx)し、内節から細胞外へ放出されて暗電流が生じているが、光刺激で上述のように外節膜抵抗の増大によりこの暗電流が抑制され、その結果細胞内電位が深まる、すなわち過分極性になると説明されるに至った⁵⁾。結局イカのような光受容器と脊椎動物の場合とで受容器電位の発生機構が異なり、特に過分極性になるのは他の興奮系にはあまり観察されていなかった電気的現象と考えられた。従ってそのイオン過程の機構が注目されるといえる。

なお、ERGの研究に関連して、Brownら⁶⁾が潜伏期が極端に短かく、強力な閃光で始めて生ずる二相性の早期受容器電位(ERP)をみつけた。さらに現象的には、GranitのP III成分からなるERGのa-波が時間的におくれて検出されてくることが分ったので、ERPに対しこの電位変化を晚期受容器電位(LRP)と呼ばれるに至った。ERPについては、後の研究から⁷⁻⁹⁾二相性の電位変化のうち、速い相は0°C以下でも観察されること、またERP自体は視物質のロドプシンの光退色に密接に関連して生ずることなどが判明しているため、現在では、視物質の光化学反応自体と、さらにそれに共役して何らかのイオン過程が出現し、恐らくそれがERPとして検出され、結局そのような現象がLRPを誘発しているのではないかと推察される。従って、ERPの生理学的意義やLRPとの直接的な関係、さらには富田らが観察した過分極性電位変化との関係などが説明すべき残された問題であろう。

II. 過分極性電位変化の発生機構の研究とカルシウムイオン説

脊椎動物の光受容器が光反応で過分極性電位変化を生ずることは、富田らが観察した当時は特殊な現象として、確認のための追試が多く行なわれたが、視細胞内、殊に外節におけるイオン過程の研究、あるいは視覚初期過程の分子的機構の研究に興味の目が一斉にそそがれるに至った。

Haginsら¹⁰⁾は視細胞外節への Na-influx が外液の Ca-イオン濃度に依存して変化する結果をえたのを基礎にして、Ca-イオンを伝達物質とする次のような興味ある仮説を提唱した。即ち、光受容に際し、外節円板上に存在するとされている視物質が光退色し円板膜構造が変化するため、円板膜に含まれる Ca-イオンが細胞質中に放出され（後に、1光子で1円板から1000ヶの Ca-イオンを放出すると主張している）、次いで外節細胞膜に移動してNa-チャンネルを閉じる。従って暗電流を抑制するに至るとする説である。¹¹⁾ この有力な仮説を実証しようとする研究が続出した。たとえば、円板膜結合の Ca-イオンが光によって細胞質中に放出されることがCone¹²⁾やBontingら¹³⁾による実験から主張されている。しかしなお不十分な点も多く、Na-チャンネルの閉鎖機構やCa-ポンプ機構などは全く不明であり、また光反応に続く電位発生への伝達物質として Ca-イオン以外の要因が存在するかもしれない。なお光受容器における Ca-説が提唱されることは、神経と筋肉とを結ぶ神経終板でのCa-イオンの動きや筋肉における興奮—収縮連関に際してのCa-イオンの役割を考えて、興奮系に共通した法則性になることで誠に興味ある考え方と云えよう。

さて、視細胞外節での暗電流の本体として Na-イオンの流入が主張されていることを前述したが、外節におけるこの種のイオンの透過性に関する研究が多く行なわれている。その中で、Korenbrotら^{14, 15)}の実験で興味ある方法が採用されている。彼らはカエルの杆体外節(ROS)を調製し、光学顕微鏡で検鏡しながら、一定の外液を流流することで外節の長さの変化を測定した。実験では高浸透価の Na-イオンや K-イオンを含む液を流流し外節が収縮して長さが短小化する度合を時間的に追跡している。すなわち、高浸透圧の K-イオンの場合は1度短縮した外節の長さは恢復しないが、同じ高浸透価の Na-イオンの場合は1度短縮しても時間とともに恢復する。さらに、光をうけた場合はその恢復が抑制されることを観察している。すなわち内向きの透過性が K-イオンにはみられないで、Na-イオンにみられるので、これが暗電流の本体と判断できるとした。なおこの種の実験から、毎秒 2×10^9 ヶの Na-イオンが外節に流入すると主張している。同様の結果は Bowndsら¹⁶⁾によっても確認されている。

K-イオンの動きについてはCavaggioniら¹⁷⁾が食用ガエルの ROS を材料にし、 ^{42}K や ^{86}Rb を使い、それらの外節からの efflux をしらべ、光効果をみた結果、K-efflux が抑制をうける結果をえている。この現象も Na-イオンの動きと対応するものであろう。

浸透性の検討から行なわれたイオン過程の研究以外に、イオンの動きを蛍光分析その他の方法で直接測定した実験など多くの報告がみられる。Etingof¹⁸⁾の総説によると、数年来多くの研究者により、視細胞外節におけるカチオン（主に Na と K ）の分布や光反応によるそのレベルの変動の追究がなされてきている。えられた結果は必ずしも一致していない。恐らく実験試料（主に ROS ）の作成方法や実験操作の差違に由来するものと推察される。著者らも以前よりウシ網膜を使って ROS 中に含まれる Na, K ならびに Cl などを放射化分析の方法で検討してきた^{19, 20)}。予備実験の結果¹⁹⁾からは Bontingら²¹⁾がえた結果と同様に光反応で ROS の Na-量が増し、K-量が減少したとみなせる結果をえて、富田らが主張する暗電流に関する考えとは全く対立するものであ

った。そこで著者らはさらに実験を積み重ね、ウシのROSだけでなく、フナのROSも使用し、実験方法も種々変えて検討し直してきた。本論文では今までえられた結果をここにまとめ、Etingof¹⁸⁾らがえた結果やBuckser²²⁾が観察したものと比較検討し、外節におけるイオン過程ひいては視覚初期過程の分子機構について考察を試みてみた。

III、放射化分析による ROS におけるイオン過程の研究

§ 1. 実験材料と方法

A. 牛眼からの ROS の調製

屠殺場で死後15分までの新鮮な牛眼を集め、マホー瓶に氷で冷却しながら実験室に持ち帰った。屠殺約1時間後赤ランプのもとで網膜を剥離し、氷冷したシャーレに入れたクレープス・リンガー液中にうかし、約1cm²の大きさの組織片を4枚切り出し、各片を等分して1方を実験側に、他方を対照側として使用した。

網膜を使った実験は次の2種類の条件が設定された。

i) 室温で15分間、白色光または560nm以上の波長の橙色光で照射する。その間対象側を暗置した。

ii) 試料を5分間温度平衡させてから、いろいろの外液中に30分間、37°Cでインキュベートした。この条件は、かつて世古口²³⁾がウシ網膜のK-レベルを維持するために用いた実験条件が参照されている。基本液(BM)としてはNaCl(80mM)、KCl(40mM)、MgCl(2mM)、Tris-HCl干渉液、pH7.2(40mM)が使われた。濃度は終濃度を示している。

次いで網膜組織片はデキストリン加水分解物(ブドウ糖10分子よりなる多糖類を主成分としている；八洲薬品会社より購入)または蔗糖を用い、比重差を利用した勾配遠心沈澱法でROSを分離した。この場合、実験側と対照側とを1組にして同時に操作し、同条件の試料をえるよう特に注意を払った。えられた外節はそれぞれを直ちに凍結乾燥した。乾燥標品は秤量し、ポリエチレン製の細小管中にこれを封入し、放射化分析用の試料とした。

比較実験のため、1部カエルROSを使っているが、この場合は一晩暗置した食用ガエルから網膜を剥離し、左右交互に2または4枚ずつを集めて1組とし、1方を室温で10分間照射し、その間他方を対照とした。その後直ちにウシの場合と同じ方法でそれぞれのROSを調製した。

B. フナの ROS の調製

飼育業者より求めたフナを一晩暗置してから眼球を摘出し、冷却した淡水魚用リンガー液中で網膜を剥離する。2枚あるいは4枚の網膜をスライドグラス中に軽くなすりつけるようにして外節を分離し、時には2枚のスライドグラスの間に網膜をはさみ、ゆるやかにすり合わせて外節を分離した。光学顕微鏡で観察した限りでは、大部分ROSで殆ど健全にとり出されていると判断され、室温で少くとも約30分間は形態変化がみられなかった。

照射実験には10⁻⁴MのCa-ならびにMg-イオンを含む1/15Mの燐酸アンモン溶液(pH6.4)

に上述のフナ ROS を懸濁させ、その $50\mu\text{l}$ を放射化分析用ポリエチレン製細小管に分注し、これを試料として用いた。照射光は 100W の幻灯用光源を用い、 10cm の厚さの水層で熱線を吸収させて、 30cm の距離にある試料に照射した。その後直ちに遠心沈澱 (5°C 以下で $10,000\text{rpm}$, 1 分間) してからその上澄を $45\mu\text{l}$ ピペットでとり出し、無灰濾紙 (東洋濾紙製 No. 7), (1cm^2) に吸着乾燥させた。この標品を放射化分析に使っている。

C. 放射化分析

本研究は、京都大学附置の原子炉実験所における共同利用実験の研究として採択されたもので、放射化分析に関する一連の実験はすべて前記実験所で実施せられた。すなわち試料を封入したラビットを気送管で炉中心部へ送り込み、熱中性子線束 $2.34 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ で 15 分間 (初期には 30 あるいは 60 分間) 照射した。放射化試料は直ちに稀塩酸で加熱抽出を行ない、 K , Na , Cl などを充分とり出した。この液を焦点クロマトグラフィによって Na と K を分離、^{※4} そのクロマトグラムにおける K -バンドや Na -バンドを標準液の場合と比較しながら確め、その濾紙の部分を取り出して放射能を計測した。この場合は減衰の速い ^{38}Cl は検出できず ^{42}K と ^{24}Na のみが求められた。放射能測定は NaI -波高分析器 (マルチ・チャンネルのもの使用) で行なった。その後、 $\text{Ge}(\text{Li})$ -検出器が使われるようになってからは放射化後の化学処理を止め、非破壊のまま放射

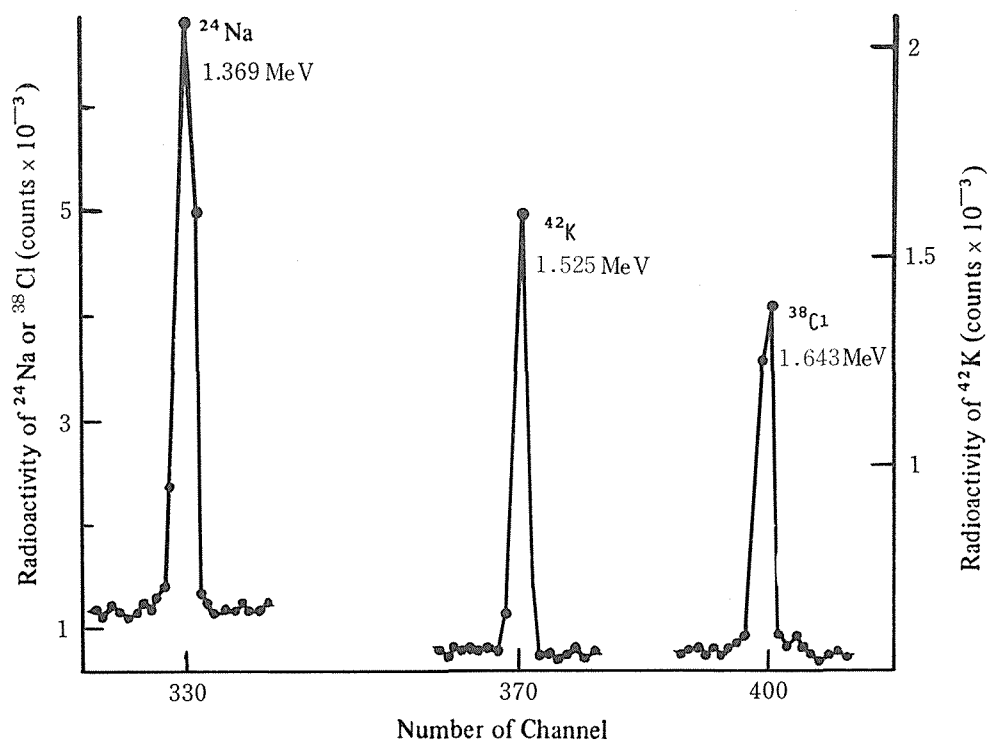


Fig. 1 Energy Spectra of γ -ray from three radioactive isotopes

能測定を行なった。ただし、半減期の早い（半減期38分） ^{38}Cl は NaI-検出器で速かに測定してから Ge (Li)-検出器にかけ、また数時間か一晚放射能を減少させてから NaI-検出器で再び ^{24}Na を測定した。さらに Ge (Li)-検出器の場合も ^{38}Cl は短時間計数で、 ^{42}K は長時間計数することで測定値の精度を上げる努力がなされた。また非破壊試料では ^{24}Na 、 ^{42}K と ^{38}Cl が γ -線スペクトルで各々のエネルギー・ピークが近接しているので、短かいチャンネルの範囲内で測定可能で、いかえると同時測定の利点がみられる。すなわち ^{24}Na : 1.369 MeV, ^{42}K : 152 MeV, ^{38}Cl : 164 MeVのようにそれぞれのピークが近接している。しかも Ge (Li)-検出器では各々の放射能が重なることなく測定可能であった。なお、試料封入のポリエチレン細小管はブランク・テスト用のものをどの実験系列でも用意し、標準試薬には 99.99%純度の NaCl と特級の KCl (あるいは K_2CO_3) を用い、その放射化による ^{24}Na 、 ^{42}K 、と ^{38}Cl の放射能から試料の Na-, K-, ならびに Cl-量^{*5}が計算された。フナ⁵の試料ではポリエチレン細小管の代りに無灰濾紙を使った。

Table 1 CHANGES OF Na- AND K-LEVEL IN CATTLE ROS AFTER ILLUMINATION

Sample	Exptl. condition	Na-content		K-content	
		$\mu\text{mol/gDW}$	Difference (%)	$\mu\text{mol/gDW}$	Difference (%)
1. Cattle Ros	in light	75.2	+30	70.0	-25.6
	in dark	57.8		94.1	
2. //	in light	53.9	+16	17.6	-27
	in dark	46.5		24.1	
3. //	in light	10.4	+26	6.2	-20
	in dark	8266		7.7	
4. Cattle ROS*	irradiated	80.0	+11.5	—	—
	dark	71.7		—	
5. Frog ROS	in light	59.8	0	6.8	- 6.9
	in dark	59.8		7.3	

* In Exptl. 4, sample was irradiated for 10 min. at room temperature after preparation of ROS in dark.

§ 2. 実験結果

I) 単純照射の効果

ウシの網膜組織片を切り出し、15分間室温で白色光（表1の実験例No.1と5）あるいは570nm以上の橙光色（表1のその他の実験例）で照射し、直ちに ROS を調製し、各々の Na-量と K-量とを決定した。結果は表1に示した。ウシ（カエルも同様）の試料では、各元素量は乾燥重量

(gDW) 当りの μmol で示している。なおこの表 1 の実験結果のみ焦点クロマトグラムにより、 Na^- と K^- 量とを測定したものである。

照射したウシ網膜からえた ROS は何れも Na^- 量が増し、 K^- 量が減少していた。しかし、ROS をデキストリン加水分解物を用いて調製してから照射（実験 №.4）した場合ではその傾向は明かでない。さらにカエルの場合は、照射された網膜からえた ROS では Na^- と K^- 量とも対照と変化していなかった。なお Cl^- 量は汚染のためか再現性のある結果がえられなかった。

II) 代謝基質，代謝毒で網膜をインキュベートした場合の ROS のイオン・レベル

基質としてグルコース (0.2%) と Na^- グルタメート ($2 \times 10^{-2} \text{ M}$) を使った。また膜 ATPase 活性を抑制するウアバイン ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) や呼吸毒の KCN (10^{-2} M) が用いられた。さらに ROS の調製にデキストリン加水分解物も使用したが蔗糖の場合と同傾向の結果を示した (表 3 と 4 の比較から)。えられた結果は表 2 ～ 4 に示す。表 2 と 3 の実験は暗黒で行なった。

i) 網膜のイオン・レベルの変動

表 2 に結果を示す。組織レベルでは代謝基質のグルコース・グルタメート (G-G) を加えると、かつて世古口がえた結果²³⁾と同様であったが、ウアバイン効果がみられ、これらのイオン・レベルの維持に Na^- 、 K^- 活性化 (膜) ATPase 活性が関与することを示唆した。

Table 2 CHANGES OF Na^- , K^- , AND Cl^- LEVEL IN CATTLE RETINA AFTER INCUBATION IN VARIOUS CONDITIONS OF MEDIA

Exptl. Condition	Na-content		K-content		Cl-content	
	$\mu\text{mol/g DW}$					
BM	157		193		146	
BM + Ouabain	194	+23.6%	119	−38 %	192	+31.2%
BM + G-G	122	−22.3%	248	+28.5%	133	− 8.9%
BM + G-G + Ouabain	175	+11.5%	174	− 9.8%	128	+11 %

ii) ROS のイオン・レベルの変動

既述のようにこの実験ではウシ網膜の組織片を表出の条件でインキュベートしてから直ちに ROS を調製して放射化分析によりイオン・レベルの決定を行なった。表 3 と 4 に結果を示す。同一網膜から作成した組織片を 2 組に分けて基本液で処理した場合、表 3 の実験系列 №.1 と 2 に示すように、少なくとも Na^- 量の誤差 (4%) は小さく、一方 Cl^- 量では表 4 の結果も考え合わせ比較的誤差が大きいことが判断された。

表 3 の結果は、ROS においても組織の場合と同様の傾向を示した。すなわち基質 G-G とウアバインの条件を与えた場合を基本液の BM を対照にした場合と比較すると、 Na^- ポンプが存在す

るような傾向を示唆した。

次に表 4 には光効果を主に観察した結果が示されている。基質 G-G で処理しても表 1 の実験系列でしらべた光効果と全く等しい結果を示した。ウアバイン効果は表 3 と 4 の結果を照合し、光効果と同じ傾向でさらにそれを強めたとみなされるが、表 4 実験系列 №. 3 からウアバイン処理の試料では光効果がみられなかった。また実験系列 №. 4 から、使った条件では呼吸抑制剤 KCN はその効果を示さなかった。なお前述のように ROS における光効果が観察されたが、Na- レベル

Table 3 Na- AND Cl-LEVEL OF ROS OBTAINED FROM INCUBATED CATTLE RETINAS

Exptl. Condition	Na-content	Cl-content
	$\mu\text{mol/g DW}$	
1 . BM	46.8	82.7
2 . BM	45.1 - 4%	88.3 + 7%
3 . BM + G-G	27.5 -41%	56.1 -32%
4 . BM + G-G + Ouabain	60.6 +29%	76.1 - 8%

Table 4 EFFECT OF ILLUMINATION ON Na-, K-, AND Cl-LEVEL OF CATTLE ROS
INCUBATED IN THE VARIOUS CONDITIONS OF MEDIA

Exptl. Condition		Na-content	K-content	Cl-content
		$\mu\text{mol/g DW}$		
1 . BM + G-G + Ouabain BM + G-G	in dark	11.1 +25 %	10.4 -41.6%	17.1 +87 %
		8.84	17.8	9.18
2 . BM + G-G BM + G-G	in light	10.1 +28 %	13.4 -33 %	19.1 -13 %
	in dark	7.86	20.0	24
3 . BM + G-G + Ouabain	in light	4.55 \div 0	7.27 + 9.5%	9.0 + 5.5%
	in dark	11.1	12.6	18.7
4 . BM + G-G + KCN BM + G-G	in dark	4.55 \div 0	7.27 + 9.5%	9.0 + 5.5%
		4.51	6.64	8.54

が高められ K-レベルが低下していることに注目される。さらに Cl-レベルについては明確な説明が不能であった。ただ本実験では何れも K-量の誤差が大きいの、確実なことはそのレベルの変化の向きが大部分 Na の場合と逆向きであると判断できるにすぎなかった。

III) フナ ROS からの Na-Loss に対する光効果

ウシの場合、標品の鮮度に対する疑問は、技術上解決困難であるが、フナでは十分に暗置することで、新鮮で完全な暗網膜がえられる。さらに既述の操作でえた ROS は光学顕微鏡で検鏡する限り、殆ど intact に近いと推察され、さらに内節 (RIS) の 1 部を付着した構造のものも多くみられた。このような ROS を使って光効果をみる実験を行なってみた。この場合、デキストリン加水分解物処理で作成した ROS よりはるかに良好な標品をえている。

さて、光効果の実験では、表 1、No. 4 の結果も考え合わせ、分離した ROS では光効果は中々決定しにくいであろうと推察されるので、照射条件を吟味し、温度と時間とを適当に組合わせて追究することにした。えられた結果は表 5 と 6 とに示されている。表 5 のデータをみると、28°C のような高温 (他の系列では 30°C で実験したが全く同結果であった) では却て光で Na-Loss が促進されるような結果をえている。しかし温度が低くなると逆に Na-Loss が抑制される結果をえた。表 5 の高温での傾向は、0°C でより長く光照射した場合と似た結果を示していて、表 6 にみられるように、10 分間になると抑制よりむしろ促進とみえる結果をえている。兎に角低温で光照射時間が短いと Na-Loss が抑制されることが判明した。

Table 5 Na-LOSS FROM CRUCIAN CARP ROS BY LIGHT AT VARIOUS TEMPERATURES

Sample	temperature (°C)	incubation time (min.)	Na-content	
			μ mol.	difference (%)
1. Illuminated Control	28	3	0.356 0.323	+10
2. Illuminated Control	28	3	0.592 0.498	+19
3. Illuminated Control	28	1	0.417 0.398	+ 4.8
4. Illuminated Control	20	3	0.858 0.786	+ 9.8
5. Illuminated Control	27	3	1.36 1.36	0
6. Illuminated Control	1	3	0.478 0.509	- 5.9

ROS-suspension in M/15 ammonium phosphate (pH 6.4) was irradiated by white light (100 W projector lamp, 30 cm distance, 10 cm water layer).

Table 6 Na-LOSS FROM CRUSIAN CARP ROS BY LIGHT

Exptl. Condition	Incubation Time (min.)	Na-content (relative value)
1. Irradiated Dark	3	93.8
		100
2. Irradiated Dark	5	102
		100
3. Irradiated Dark	10	108
		100

All samples were incubated at 0°C.

Other experimental conditions were the same as in Table 5.

§ 3, 考察

ROS におけるイオン過程の研究は、もともと著者らの 1 人、世古口が膜 ATPase 活性を発見し、これが恐らく 1 価カチオンの ROS でのレベルを調整すると考察した結果^{24, 25)}実際に ROS でのイオン・レベルの動き、さらにそれに対する光効果を決定するための実験が進められたことによると説明できる。従って、実験条件、特に ROS の調製は前記の酵素活性を決定する際使用された方法に準じて実施されている。すなわち、網膜をインキュベートする外液は最近の世古口らの実験²⁵⁾も考慮して使われ、ROS も組織レベルで実験してから後に作成せられている。なお ROS の分離に砂糖を使うと浸透ショックを与え、その結果 intact な形態は維持できないといわれているので、実験の一部ではデキストリン加水分解物で処理した場合もあった。既述のように、確かによい標品が多いと判明したが、フナの場合程の均一性はえられなかった。現在では“Ficoll”のようなものが使われれば前記の浸透ショックはもっと柔げるものと考ええる。但し本実験で実施した限りではよい標品をえた場合でも本質的に異なる結果をえていない。このように標品がどのような形態、成分から成り立っているかが判断できないと、えた結果の説明も充分なものがえられないと考えられた。従って Etingof 一派の実験のように（文献 18 参照）、電子顕微鏡で検定する必要があると考えるが、機会がえられなかった。ただし、光学顕微鏡で検鏡する場合、ウシで蔗糖による分離では、大部分 intact のままの ROS は殆どえられないで、恐らく円板を主体とした vesicle または vacuole よりなると推察された。

また光効果をみる場合、白色光または橙色光を使ったが、視物質が直接関係しない（えたデータは光の性質には無関係）と判断された。また焦点クロマトグラムで分離した試料と非破壊試料とでえられた結果、特に光効果は表 1 と 4 の結果の検討から変化はなかったと判断された。かくして、ウシ ROS では、結果の検討から、推察ではあるが、後述のように多くの示唆をえたと考

えている。

次に実験結果についてみると、表1に示すように、ウシ ROS では、光により Na⁺ レベルが高まり、K⁺ レベルが低下する結果とみなされ、これでは intact の ROS では Na⁺-influx が増大したことになり、既述のような Tomita らが主張する、光反応による過分極化は生じないと判断される。また当時は、Bonting ら(1967)²¹⁾の結果と同様であったが、なお検討が必要であると考えた。また、表1と4とでえられた実験結果は、ウシ網膜の組織片で一定時間光照射してから ROS を分離する操作を行なっている。技術上の難点は考えられるが、光効果で ROS からの Na⁺-Loss (外節膜での efflux を考えるが、内節への移送を考え合わせてもよいであろう)が抑制され、受動的に K⁺ レベルが逆の傾向を示したとみると、Na⁺ レベルの増大した結果がよく説明できる。またウェアバイン効果は杆体内節 (RIS) での Na⁺ ポンプ (この場合は細胞外への排出) が抑制され、結果的に外節特に後述するように、外節円板内に強く捕捉される結果であるとする、Na⁺ 量が対照より増加していることが説明できるし、恐らくその効果が光の影響より大きい、ウェアバインを含む試料では光効果がみられなかった (表4, №3) のものと判断される。

さて世古口²³⁾がウシ網膜の K⁺ レベル維持に代謝基質 G-G が有効であること、しかし光効果がみられることを報告しているが、表2の結果はそれを確認している。ただウェアバイン効果が Na⁺ レベルに強くでていることを前述したが、いま、実験に使われたウシ ROS が円板を主体としていること、ROS にみられる膜 ATPase が1価カチオンのレベル調整に役立つとすると次の考察が可能になろう。すなわち、世古口ら²⁵⁾によると、ウシ ROS でみられた膜 ATPase 活性は、円板にも存在していることが示唆されている。最近の Hemminki²⁶⁾の報告によると、ウシ ROS は intact のままではこの酵素活性は検出しにくい、浸透ショックで円板を露出すると顕著な活性がみられ、円板表面に局在することが結論づけられるという。従って、本実験でえられた表1から表4までの結果を、今円板を標品として観察したものと考え、上記の酵素の局在性と考え合わせ、恐らく、細胞質中で円板の内外で1価カチオンの Na⁺ と K⁺ イオンに濃度勾配があつて、光によってそれが変化するものと推察される。

Etingof のグループ (文献18参照)の研究によると、ウシやカエルの ROS において、光効果で円板内に Na⁺ が蓄積されることを電顕像で観察し、さらに生化学的な分析から円板のリピド中に Na⁺ が含まれていることを確認している。これらはわれわれの結果からの考察の合理性を強く支持するものと考え。

最近 ATP により、視物質のタンパク質成分であるオプシンが燐酸化される Kinase や ATP-依存性でさらに光で活性が促進される環状ニュークレオチド (cAMP と cGMP)・ホスホジエステラーゼとが存在していて、Ca²⁺ ポンプの機構またはそれらの調整に関与することが考察されてきている (吉沢ら²⁷⁾・三木²⁸⁾の総説参照)。

恐らくこれらの系が Ca²⁺ ポンプに直接関係する (燐酸化オプシンが Ca²⁺ イオンに対する円板からの逸出をさまたげるという研究など) となると、1価カチオンと膜 ATPase 系は二

次的に Ca^{2+} イオンの円板からの放出あるいは円板へ摂取されるための電位勾配をつくるとか、あるいは円板から ROS の形質膜までのトランスポートに役立つ（濃度勾配から Ca^{2+} イオンが流動し易い電位勾配をつくるのに役立つ）と考えられないであろうか。

次に、ウシ ROS での光効果は Na^{+} -Loss を抑制すると考えたが、間接的であったので、フナ ROS を使い、より直接的な結果をえ、Tomita の過分極性電位の検討を試みてみた。表 5 と 6 でえられた結果をみると、このような標品では、低温（ 0°C 乃至 1°C ）で短時間（3 分間）の条件では光効果は Na^{+} 抑制を生ずることが分った。Buckser ら²²⁾ がウシ ROS 懸濁液で同様な観察を行なっている。ただし彼らの場合は光照射後一定時間暗置してから遠沈で上澄をとり出し逸出してくる Na^{+} （いいかえると Na^{+} -Loss）をしらべている。データは一定時間の暗置（2～4.5 分）で却て Na^{+} の逸出が増すのは、光で抑制されていたのが不可逆性標品のため、上記の時間後に放出されたと考察している。われわれの実験では、遠心沈澱で上澄をとり出すのに 3～4 分かかり、しかも暗保して行なっているので、全く似た条件を設定したといえる。なおわれわれはさらに温度条件を変えて、光効果の現象を低温で明かにしたものとは判断している。また Korenbrot ら¹⁴⁾ や Bownds ら¹⁶⁾ は ROS の浸透性行動を利用して、 Na^{+} や K^{+} の透過性を巧妙に検討した。われわれも

Table 7 EFFECTS OF HYPERTONIC SOLUTIONS ON THE OSMOTIC BEHAVIOR OF CRUSIAN CARP ROS

	ROS (relative length)	RIS (relative volume)
1. Ringer soln.	102	1.2×2.0
2 Is NaCl soln.	96 — 6%	1.4×1.5
2. Ringer soln.	98	1.2×2.5
2 Is KCl soln.	88 — 10%	1.8×2.0

RIS: Rod Inner Segment

2 Is: 2 times higher than isotonic solution

表 7 に示すように予備実験的に追試を試みた。ROS についての結果はやはり Na^{+} の方が透過し易いことを示唆している。しかし内節（RIS）では逆の様にみえる。われわれの標品を検鏡すると外節に付着して内節が円錐状にみられる。オキュラ・マイクロメーターで相対的な価で、円錐状にみられる内節部分の短径と長径とを測定すると表 7 の RIS についての結果のようになった。これでは高浸透圧の NaCl 中ではむしろ縮小気味に観測されたが、同条件の KCl 中では、球状に大きくふくれるように変形して行くのが観察された。これらは充分検討をくり返す必要があり断定するには早い。内節で強く Na^{+} ポンプ機構が働いていることを示唆していると考えられる。ウシでウェアバインの効果は既述のようにむしろこの機構に働いて、外節から内節へ Na^{+} イオンの吸上げを強く抑制し、外節にたまる同イオンが強く円板に吸着されたのをわれわれが観察したの

ではなかろうか。何れにしても外節におけるイオン過程は、外節形質膜と円板と二段構えになっていると推察され、さらにその原動力として内節のNa-ポンプ機構が強く作用している、ポンプは3種類存在しているのであろうと考えられる。結局われわれが観察した結果は別の方法でTomitaの暗電流説（結果的にはHaginsのCa-説も含めて）を支持したものと見える。しかしこれらの機構の明細はなお推察の域をでない。さらに多くの検討が望まれるのである。殊に種々の酵素活性の役割についてはやっと緒についた所で、特にそれらの研究発展が望まれる。

IV、総括

1、視覚初期過程の研究は、富田グループの光刺激に伴う過分極性電位の検出成功で大いに進展し、その暗電流説は特に注目される。受容器電位発生機構の研究の基礎になったといえる。

2、HaginsがCa-説を提唱し、富田説とともに、視覚初期過程の分子的機構研究の展望が開かれたといっても過言ではなかろう。現在はこの仮説の実証に多くの関心が集中している。

3、著者らは放射化分析による視細胞外節におけるイオン過程の研究を続けてきた。ウシ杆体外節では、光効果でNa-量が増大していることから、Na-Lossが抑制されることが示唆されること、また標品作成条件や外節の膜ATPase活性の検討からNa-イオンが円板内外の電位勾配に役立つことなどの考察を試みた。

またフナ杆体外節でも光でNa-Lossが抑制されることや内節のカチオンに対する浸透性行動からの検討で、外節におけるNa-イオンの透過性が光で抑制される結果をえている。

V、謝辞ならびに註記

放射化分析に関する研究の1部は、世古口に与えられた文部省科学研究費により実施されたものである。また既述のように、放射化分析の実験はすべて京都大学原子炉実験所の共同利用実験として採択された研究により実施されたため、所内責任者を始め多くの所員の方々に援助をうけ、特に同所教授岩田志郎博士や石田政弘博士にお世話になった。これら多数の方々に心から感謝の意を述べたい。さらに初期の実験（表1～表4）は大阪大学理学部生物学教室で行なったものを含み、当時の教授の故本城市次郎博士の指導・忠告をうけている。先生の霊にこのささやかな論文を捧げて感謝の意を表したい。なおその初期の実験では鈴木龍夫博士が直接実験に加わり、論文作成に当って種々貴重な助言をうけたし、また当時のスタッフ、殊に吉沢透博士や鬼頭勇次博士らから多くの有益な批判と援助をうけた、ともに厚く謝意を申し述べたい。

註*1：現所属、京都大学原子炉実験所

註*2：現所属、大阪府立科学教育センター（生物学室長）

註*3：現所属、大阪府立科学教育センター（化学室長）

註*4：現広島大学教授木曾義之博士の指導で技術を習得した。深謝したい。

註*5：えられた放射能測定値の1部は、原子炉実験所武内孝之博士により、電子計算機を使用したデータ検定をうけた。Kの値の誤差が大きいものがみられたが、Na-値については信頼度の高いものがえられて

いて、引用したデータは少くとも±3%以内の誤差のものであることが分った。援助をうけたことに對し厚く謝意を述べたい。

VI, 文献

1. Granit, R.: Sensory Mechanism of the Retina, Oxford Univ. Press, London, 1947
2. Hagins, W. A., H. V. Zonana, & R. G. Adams: Nature, 194(1962)844
3. Tomita, T., A. Kaneko, M. Murakami, & E. L. Paulter: Vision Res., 7(1967)519
4. Toyoda, J., H. Nosaki, & T. Tomita: Vision Res., 9(1969)453
5. Tomita, T.: Quart. Rev. Biophys., 3(1970)179
6. Brown, K. T. & M. Murakami: Nature, 201(1964)626
7. Pak, W. L. & R. A. Cone: Nature, 204(1964)836
8. Pak, W. L. & T. G. Ebrey: Nature, 205(1965)484
9. Cone, R. A.: Science, 155(1967)1128
10. Hagins, W. A., R. A. Penn, & S. Yoshikami: Biophys. J., 10(1970)380
11. Hagins, W. A.: Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1(1972)131
12. Poo, M. & R. A. Cone: Exp. Eye Res., 17(1973)503
13. Hendricks, Th., F. J. M. Daemen, & S. L. Bonting: Biochim. Biophys. Acta, 345(1974)468.
14. Korenbrot, J. I. & R. A. Cone: J. Gen. Physiol., 60(1972)20
15. Korenbrot, J. I., D. T. Brown, & R. A. Cone: J. Cell Biol., 56(1973)389
16. Bownds, D. & A. E. Brodie: J. Gen. Physiol., 66(1975)407
17. Cavaggioni, A., R. T. Sorbi, & S. Turini: J. Physiol., 232(1973)609
18. Etingof, R. N.: Vision Res., 12(1972)929
19. Sekoguti, Y. & T. Yoshizawa: Proc. 4th ISCERG Symp. (JJO vol. 10, Supple., 1966)29
20. 松本昭・松谷幸司・世古口雄三：昭和45年度原子炉の医学・生物学利用専門研究会報告集（1972）42
21. Bonting, S. L. & A. D. Bangham: Exp. Eye Res., 6(1967)400
22. Buckser, S. & C. Buckser: Exp. Eye Res., 12(1971)138
23. Sekoguti, Y.: Ann. Rep. Scient. Works, Fac. Sci. Osaka Univ., 8(1960)75
24. Sekoguti, Y.: J. Cell. Comp. Physiol., 56(1960)129
25. 世古口雄三・鈴木龍夫：生理生態，印刷中
26. Hemminki, K.: Exp. Eye Res., 20(1975)79
27. 吉沢透・河村悟：生体の科学，27（1976）11
28. 三木直正：蛋白質・核酸・酵素，21（1976）605